

A program célkitűzése az érző (viszceroszenzoros és szomatoszenzoros) agypályák neuroanatómiai és neurokémiai vizsgálata volt patkányokon. A program kiemelt célkitűzése volt fiatal agykutatók képzése, idegtudományi PhD hallgatók tudományos karrierjének elindítása. Ennek érdekében a központi idegrendszer szabályozó mechanizmusa 10 pályarendszerét 8 PhD és 2 tudományos diákkörös hallgató vizsgálta 3 neuromorfológus kutató irányításával. A fiatal kutatók számos neuromorfológiai, neurokémiai és kísérletes agyműtéti technikát sajátítottak el és alkalmaztak az általuk vizsgált témában. A kutatási terv úgy épült fel, hogy mindegyik fiatal kutató feladata egy-egy pályarendszer vizsgálata volt. A tudományos program hazai és külföldi laboratóriumokkal létesített együttműködésekkel bővült. A projekt befejezéséhez 6 hónapos hosszabbítást kértünk és kaptunk.

A program célkitűzéseit összességében megvalósítottuk. A három és fél éves futamidő alatt az új eredményeinket 18 tudományos publikációban (ebből 17 nemzetközi folyóiratokban jelent meg, kumulatív impakt faktoruk: 101.077) ismertettük. Két közlemény nemzetközi folyóiratban közlés alatt áll, további 2 közlemény közlésre beküldve bírálatra vár. Két vizsgálat befejeződött, ezek kézírata jelenleg készül. A program ideje alatt a pályázat résztvevői 10 nemzetközi és 5 hazai kongresszuson, összesen 19 előadás, ill. poszter formájában ismertették eredményeiket.

A program ideje alatt egy PhD hallgató (*Dr. Bratincsák András*) védte meg téziseit, *Reichart Anikó* és *Boros Csaba* 2008-ban fog védeni.

A kutatási program során elért eredmények részletezése

1) *A vestibularis stressz pályájának vizsgálata.* Retrográd pályajelölési módszerrel a pseudorabies vírusnak a stressz válaszáért elsősorban felelős hypothalamikus magba, a nucleus paraventricularisba való mikroinjekciójával elsőként sikerült igazolni a vestibularis agymagok és a hypothalamus idegi kapcsolatát. További vizsgálatok (más jelzőanyagok alkalmazásával) igazolták, hogy e pályarendszer átkapcsolódó neuronokból épül fel (*Markia et al.*, 2008). Ezek feltárása további kísérleteket igényel. A vizsgálatok *Dr. Markia Balázs* PhD témájának részét képezik.

2) *Termoszenzitív agypályák neuromorfológiai leírása.* E vizsgálatok a korábbi (2001-2004) programból áthúzódó (*Dr. Bratincsák András* külföldi tartózkodása, majd rezidensi munkája miatt) kutatások befejező részét képezik. Munkacsoportunk korábban lokalizálta az agytörzsi hőérzékeny neuronokat patkányban. Igazoltuk, hogy a hideg és meleg szignált érzékelő idegsejtek külön csoportokat képeznek. *In vivo* termoregulációs kísérletekkel kimutattuk, hogy a hőszabályozó központ idegsejtjei nem intracraniális termoreceptorok, hanem az idegpályákon a test és a külső hőmérséklet változásait érzékelő receptorokból idegrostokon érkező szignálokat érzékelik (*Bratincsák, Palkovits* 2005). Az agytörzs termoszenzitív idegsejtjeiből eredő és a hypothalamus preoptikus magjaihoz vezető pálya létezését antero- és retrográd pályajelölési módszerrel mutattuk ki, és topográfiáját elsőként írtuk le (*Bratincsák et al.* 2008).

A National Institute of Mental Health (NIMH) kutatóival való együttműködés egy ritka lehetőséget nyújtott a termoreguláció központi idegrendszeri szabályozásának extrém körülmények – mesterséges hibernáció – közötti funkcionális morfológiai vizsgálatára. A hibernáció kezdetétől a normális testhőmérséklet visszanyeréséig terjedő 6 fázisban az idegsejtek aktivitását jelző „immediate early gene”, a *c-fos* mRNS-ének *in situ* hibridizációs kimutatását az agy valamennyi területén elvégeztük. A hőmérséklet változása okozta

változásokat az agy valamennyi szabályozó rendszerében nyomon követtük (Bratincsák *et al.* 2007). Elsőként írtuk le a hibernálás létrejöttében, fenntartásában (az agyi működés 5 °C hőmérséklet alatti fenntartásában) és feloldásában részt vevő agyi szabályozó rendszereket, amivel a ma divatos, de kutatócsoportunk elmúlt 10 évének tevékenységét meghatározó, ún. „system neuroscience” kutatási irányzathoz és szemlélethez adtunk példát. A vizsgálatok eredményei képezték az alapját Dr. Bratincsák András PhD disszertációjának, több nemzetközi kongresszuson tartott előadásának, ill. az ott bemutatott poszttereinek.

3) *A trigemino-hypothalamikus érzőpálya vizsgálata.* A trigeminus-neuralgiában szerepet vivő, a trigeminus-eredetű fájdalom által kiváltott akut stressz neuroanatómiai pályáját kombinált technikák (pályajelölési módszer, agytörzsi műtétek, immunhisztokémia, *in situ* hibridizációs hisztokémia) alkalmazásával vizsgáltuk. A fogpulpába, ill. a szájnyálkahártyába adott izgató anyag által aktivált idegsejteket *c-fos* immunfestéssel lokalizáltuk az alsó agytörzsben, majd az ebbe a területbe adott anterográd pályajelöléssel a hypothalamusba felszálló rostokat nyomon követtük. Az agytörzs sorozatmetszeteinek kiértékelése folyamatban van, egyes részeredményeikről egy nemzetközi kongresszuson számoltunk be (Palkovits 2006).

A célkitűzések között szerepelt a trigemino-hypothalamikus pálya neurotranszmittereinek kémiai karakterizálása. *In situ* hibridizációs hisztokémiai és pálya-átvágási technikák együttes alkalmazásával igazolást nyert, hogy a pálya rostjai között vasoactive intestinalis polipeptid (VIP)-tartalmú idegrostok is futnak, melyek sejtjei az érző trigeminus-mag egyik jól körülírt – eddig nem publikált – sejtcsoportjából erednek. Az innen eredő idegrostok végződéseinek feltérképezése folyamatban van. Több feltételezett neurotranszmitter (CGRP, NPY, neurotensin, substance P) vizsgálatára is sor került, ezek jelenlétét a pálya rostjaiban nem tudtuk igazolni. E vizsgálatok során viszont olyan megfigyeléseket tettünk, melyek részletes feldolgozása során egy, az agytörzsből eredő calcitonin gene-related peptid (CGRP)-tartalmú pályarendszer topográfiáját sikerült részleteiben megismerni és közölni (Dobolyi *et al.* 2005).

4) *Cortico-amygdalo-autonom pályarendszer.* Pályajelölési és átvágási módszerekkel igazoltuk, hogy a limbikus (medialis prefrontalis) agykéreg egy multiszinaptikus pálya révén (átkapcsolódások az anterior cingulate cortex-ben, az amygdala basolateralis, majd a centrális magjában) idegi kapcsolatban áll a nervus vagus visceromotoros idegsejtjeivel (Reichart *et al.*, közlésre elküldve). E pályarendszer topográfiai leírása morfológiai alapját képezi azon korábbi – részben saját – megfigyeléseknek, hogy a mediális prefrontális agykéreg részt vesz a gyomor működésének szabályozásában. Az eredményekről két kongresszuson számoltunk be (Reichart *et al.* 2005, Bencze *et al.* 2006). A téma Reichart Anikó PhD téziseinek részét képezi, melyet 2008 őszén fog megvédeni.

5) *A hippocampus és a hypothalamus közötti kapcsolatok vizsgálatának folytatása* szerepelt a célkitűzések között. Erre Uhereczky Gabriella születe, majd betegsége miatt nem került sor. Ez utóbbi miatt munkaviszonyát is meg kellett szüntetnie. A tervezett vizsgálatok egy részét külföldi együttműködéssel folytattuk, melynek során elsőként sikerült patkány és humán agymintákon igazolni, hogy a vasopressin 1b receptor a hippocampus CA2 areájának piramis sejtjeiben termelődik (Young *et al.* 2006). E megfigyelés alapján tervezett viselkedési és genetikai vizsgálatok során megállapítást nyert a vasopressin 1b receptornak a szociális stressz válaszban, valamint az agresszív viselkedésben játszott szerepe. Ezen eredményekről 2008. októberében a 37th Neuroscience Society Meeting-en (Washington) számoltunk be (Lee *et al.* 2008).

6) A középagy szürkeállománya (*substantia grisea centralis*) elülső részében levő idegsejtekből kiinduló agypályák vizsgálata. A tervezett vizsgálatok Dr. Fodor Mariann tragikus halála és Dr. Bencze Viktória PhD hallgató távozása miatt megszakadtak, majd részben, nemzetközi együttműködésben (NIMH, Washington és University of Nijmegen, Hollandia) folytatódtak.

a) *In situ* hibridizációs hisztokémiai és pályaaátvágási technikákkal igazoltuk, hogy a középagy centrális szürkeállományának elülső részében elhelyezkedő VIP-tartalmú idegsejtek két irányba projíciálnak: a nucleus interstitialis (Cajal) mag sejtjei leszálló pályán át a nyúltvelőbe, a subependymalisan elhelyezkedő sejtek az előagyba küldenek rostokat, ahol a hypothalamuson és egyes limbikus agyterületeken végződnek (Fodor *et al.* 2007).

b) A nucleus subparafascicularis TIP39-tartalmú idegsejtjeinek projekcióit anterográd pályajelölési módszerrel dolgoztuk fel (Wang *et al.* 2006). Az Edinger-Westphal mag parvocellularis, urocortint termelő sejtjeinek vizsgálata patkány és humán mintákon történt. Megállapítottuk, hogy az urocortinnak a stressz válaszban vitt kitüntetett szerepét egy másik neuropeptid, az NPY stimulálja az Y5 és részben az Y1 receptorain keresztül (Gaszner *et al.* 2007).

c) További, depresszióban szenvedő öngyilkos egyének agymintáin végzett vizsgálatok során kimutattuk, hogy depresszióban az Edinger-Westphal mag parvocellularis neuronjaiban fokozott az urocortin-1 szintézise, ugyanakkor ezen idegsejtekben lecsökkent az agyi eredetű neurotrop faktor (BDNF) szintézise (Kozicz *et al.* 2006, 2008). A vizsgálatok – az újabban elnyert OTKA pályázat támogatásával – tovább folytatódnak.

7) A hypothalamus arcuatus mag neuronjainak kapcsolata a nyúlt- és gerincvelő preganglionáris idegsejtjeivel. Ismeretes a nucleus arcuatusnak a táplálékfelvétel szabályozásában vitt szerepe. Ennek a mechanizmusnak a neuromorfológiai alapjait kívántuk igazolni az arcuatus magba, ill. a gerincvelőbe adott jelzőanyagok nyomon követésével. Igazoltuk, hogy az arcuatus mag neuronjai mind a szimpatikus (gerincvelő oldalsó szarv), mind a paraszimpatikus (nucleus dorsalis vagus) preganglionaris sejtjeihez projíciálnak (Palkovits 2007, Shahr, Palkovits 2007, Kovács, Palkovits előkészületben). Feltételezhető, hogy a nucleus arcuatus, hasonlóan a hypothalamikus orexigenic-anorexigenic alternáló szabályozó szerepéhez, az autonóm idegrendszer output neuronjainak szabályozásában is hasonlóan vesz részt. Ennek vizsgálata a következő évek feladata. E vizsgálatokhoz a sztereotaxikus beadások finomított módszerét kellett kidolgozni, melynek publikálása folyamatban van (Kovács, Palkovits közlésre elküldve).

8) A gyomor és a duodenum beidegzésében szerepet vivő spinalis és supraspinalis agypályák vizsgálata. A téma kidolgozásában három tudományos diákköri hallgató (Kurucz Péter, Trájer Attila, Micskó Tímea, majd az utóbbi kiválása után Kirschenbaum Dániel) vett részt. Sikeres munkájukkal mind a budapesti, mind az Országos Diákköri Konferencián első díjat nyertek, és a Semmelweis Egyetem képviselőjében az Európai Diákköri Konferencián is bemutatták eredményeiket.

Az állatok gyomor- és duodenum falába egyidejűleg injektált retrográd, transzneurális jelzőanyag (két, különbözően jelölt pseudorabies vírus) nyomon követésével lokalizáltuk a primer (vagus és spinalis), secunder (agytörzsi) és tertier (hypothalamus, amygdala, medialis prefrontalis) idegsejteket. Megállapítottuk, hogy a gyomor és a duodenum zömmel különböző idegsejtektől kap beidegzést, ami a gyomor és duodenális fekély eltérő létrejöttének egyik oka is lehet. Vagotomizált állatokon történt kettős vírus-beadással a gyomor beidegzésében részt vevő szimpatikus idegpályák topográfiáját, ezen belül a spino-solitary pálya jelentőségét sikerült dokumentálni. Az eredményeket több kongresszuson mutattuk be (Kurucz *et al.* 2006,

2007), publikálásuk folyamatban van (Kurucz *et al.* előkészületben). Legújabb vizsgálatunkban háromszoros immunhisztokémiai festéssel igazoltuk, hogy a gyomrot és duodenum beidegzésében szerepet vivő hypothalamikus sejtek orexint és melatonin koncentráló hormont (MCH) tartalmaznak (Papp *et al.* 2008).

9) *A gerincvelő sacralis része és a filum terminale finom szerkezete.* Felderítettük a filum terminaleban levő neuronok és az ide érkező idegrostok kémiai karakterét. Kimutattuk a conus medullarisban, a gerincvelő hátsó szarvában lévő idegrostok térbeli rendjét (Boros *et al.* 2008, Réthelyi *et al.* 2005, 2008), továbbá e terület speciális ependyma struktúráját, annak labirintyszerű szerkezetét (Mitro *et al.* 2005, 2006).

10) *A gerincvelő substantia gelatinosa opioid receptorainak kimutatása.* A vizsgálatok a 2006. évi beszámolóban szerepeltek (Kozsurek *et al.* 2005a,b). A vizsgálatokban részt vevő Kozsurek Márk a kutatócsoport átszervezése után a Semmelweis Egyetem Anatómiai Intézet egy másik, Réthelyi Miklós által vezetett laboratóriumában végzi kutató munkáját, melyről másutt számolnak be.

#

További két vizsgálati csoportról és az azokban elért és publikált eredményekről kívánok röviden beszámolni. Ezek a vizsgálatok hazai és külföldi kollaborációban történtek, jelenlegi tudományos együttműködésünk részei. Ezekben a vizsgálatokban ennek a projektnek a kutatói is benne voltak. Megjegyezni kívánom, hogy a külföldi kollaborációban végzett vizsgálatok és közölt publikációk első szerzői csak kutatócsoportunk nevét tüntették fel, az OTKA támogatást nem. Mint e közlemények társszerzője tanúsítom, hogy e közlemények témái a jelen OTKA-támogatott projekt részeit képezik, és egyetlen más magyar pályázati támogatásnak sem témájában, sem azok beszámolóiban nem szerepelnek.

1) A korábbi, OTKA TS 40771 támogatással végzett, de csak annak befejezése után publikált eredmények. Ide tartoznak a Szlovák Akadémia Endokrinológiai Intézetével közösen végzett (Mravec *et al.* 2005), valamint hazai együttműködéssel (Palkovits 2007) a stressz-pályák lokalizálására végzett vizsgálatok, továbbá a nyúltvelő serotonin-sejtjeinek (Tóth *et al.* 2006), ill. a nucleus salivatorius superior és inferior magnak az afferenciáját (Rezek *et al.* 2008) leíró vizsgálatok.

2) Részvételek olyan patkány és humán agymintákon végzett vizsgálatokban, melyek az agypályák kutatásában, azok jelölésében (Dénes *et al.* 2006), biokémiai analízisében (Dwivedi *et al.* 2006), továbbá genetikai és mRNA vizsgálatokhoz (Lee *et al.* 2006, Landgraf *et al.* 2007) feltétlenül szükségesek. E vizsgálatok elvégzésére, de akár tervezésére a jelen pályázat célkitűzéseinek megfogalmazásakor még gondolni sem lehetett. Közülük kiemelő a munkacsoport által létrehozott és működtetett Humán Agyminta Bank agymintáival végzett vizsgálatok, melyek bizonyították ezen mikrodisszekciós agyminták alkalmazhatóságát neurokémiai, genomikai és proteomikai mérésekre.